

ANTIBIOTIC SUBSTANCE EPOXYQUINOMICIN C AND D, ITS PRODUCTION AND ANTIRHEUMATIC AGENT

Patent Number: JP10045738

Publication date: 1998-02-17

Inventor(s): TAKEUCHI TOMIO; TSUCHIDA TOSHIO; NAKAMURA HIKARI; IINUMA HIRONOBU; SAWA TSUTOMU; OSANAWA HIROSHI; HAMADA MASA; HIRANO SHINICHI; MATSUMOTO NAOKI; ISHIZUKA MASAAKI

Applicant(s): MICROBIAL CHEM RES FOUND

Requested Patent: ☐ JP10045738

Application Number: JP19960199249 19960729

Priority Number (s):

IPC

Classification: C07D303/36; A61K31/335; C12P17/02

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new compound having a new molecular skeleton and exhibiting antirheumatic activity.

SOLUTION: The antibiotic substances epoxyquinomicin C and D are expressed by the formula (R is H for epoxyquinomicin C and C1 for epoxyquinomicin D). The epoxyquinomicin C has the following physical and chemical properties; appearance and nature, white powder having weakly acidic nature; melting point, 168-172 deg.C (decomposition); specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = +128$ deg. (c=1.0, methanol); etc. The compound of the formula can be produced by culturing a microbial strain capable of producing epoxyquinomicin C and D such as Amycolatopsis sp. MK299-95F4 in a nutrient medium at pH6.5-7.5 under aerobic condition.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

126

17

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-45738

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 303/36			C 0 7 D 303/36	
A 6 1 K 31/335	ABG		A 6 1 K 31/335	ABG
C 1 2 P 17/02			C 1 2 P 17/02	
// (C 1 2 P 17/02				
C 1 2 R 1:01)				
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 15 頁)				

(21) 出願番号 特願平8-199249

(22) 出願日 平成8年(1996) 7月29日

(71) 出願人 000173913

財団法人微生物化学研究会
東京都品川区上大崎3丁目14番23号

(72) 発明者 竹内 富雄

東京都品川区東五反田5丁目1番11号 ニ
ューフジマンション701

(72) 発明者 土田 外志夫

神奈川県相模原市矢部2丁目3番24号 ハ
ーモニー矢部201号

(72) 発明者 中村 光

東京都台東区入谷2丁目39番地9号

(74) 代理人 弁理士 八木田 茂 (外2名)

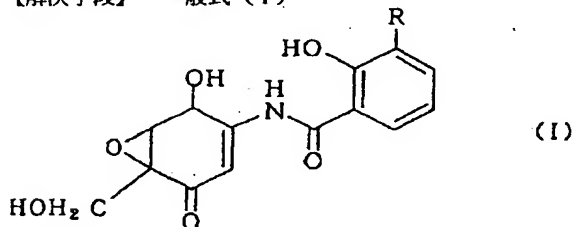
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDとその製造法ならびに抗リウマチ剤

(57) 【要約】

【課題】 抗リウマチ活性を有し且つ新しい分子骨格を有する新規な化合物を提供することを目的とする。

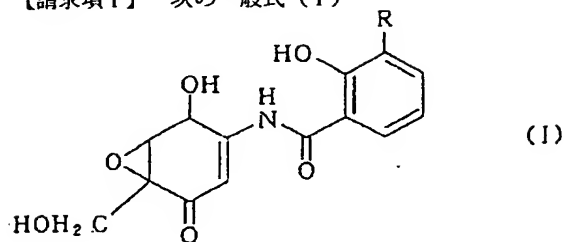
【解決手段】 一般式 (I)



(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素を示し、エポキシキノマイシンDでは塩素を示す) で表わされるエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDが新規な抗生物質としてアミコラトプシス sp. MK299-9 5F4 株の培養により得られた。エポキシキノマイシンCおよびD、あるいはそれらの塩は抗リウマチ活性を有する抗生物質である。また、先に得られた新規な抗生物質であるエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBも抗リウマチ活性を有することが見いだされた。

【特許請求の範囲】

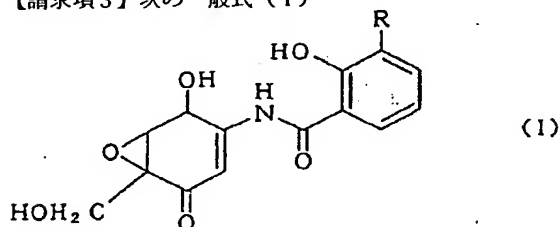
【請求項1】 次の一般式 (I)



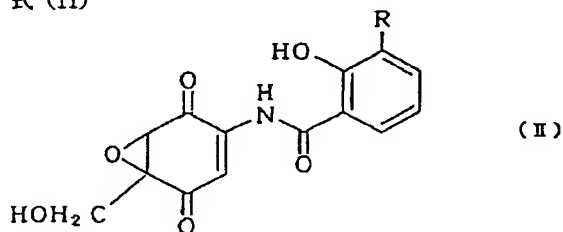
(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンD、またはそれらの塩。

【請求項2】 アミコラトプシス属に属する、請求項1に記載のエポキシキノマイシンCおよびDの生産菌を栄養培地に培養し、その培養物からエポキシキノマイシンCおよび(または)Dを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキシキノマイシンDの製造法。

【請求項3】 次の一般式 (I)



(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンD、ならびに次の一般式 (II)



(式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素原子を示し、またエポキシキノマイシンBでは水素原子を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンB、あるいはこれらの塩から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とするリウマチ剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗リウマチ活性を示す新規化合物であるエポキシキノマイシン(Epoxyquinomicin) CおよびエポキシキノマイシンD、あるいはこれらの塩に関し、またエポキシキノマイシンCおよび(または)エポキシキノマイシンDの製造法に関する。さらに本発明は、エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキシキノマイシンD、エポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBまたはそれらの塩のうちの少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗リウマチ剤に関する。

【0002】

【従来の技術】種々な多数の抗菌性物質が知られており、また種々な多数の抗腫瘍性物質が知られている。他方、従来のリウマチ治療には、ステロイド剤、酸性抗炎症剤または免疫調節剤等が使われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】細菌感染症の化学療法において、従来知られまたは使用されている既知の抗菌性化合物とは、異なる化学構造を有し且つ優れた抗菌活性を示す新しい化合物の発見または創製することは常に望まれている。また抗腫瘍性物質は、一般に強い毒性を有するものが多く、毒性が低く且つ新規な化学構造を有する抗腫瘍性物質を発見または創製することが常に望まれており、そのための研究が行われている。

【0004】また、従来のリウマチ治療で用いられたステロイド剤および免疫調節剤には、種々の副作用があることが問題であり、また酸性抗炎症剤は対症療法である等の問題から、真に有効なリウマチ治療薬の出現が望まれている。そこで、リウマチの治療または予防に有効であり且つ副作用がないまたは弱い新規な抗リウマチ剤を提供することが要望されている。本発明の主な目的の一つは、新規な抗リウマチ剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】先に、本発明者らは、抗菌活性および抗腫瘍活性を持つ新規な抗生物質を提供することを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と実用化の研究を促進してきた。その結果、土壌試料から新規な微生物としてアミコラトプシス属に属する菌株を分離することに成功し、またこの菌株について命名されたアミコラトプシスsp. MK 299-95F4株が新しい構造骨格を有する複数の抗生物質を生産していることを見出した。これら新規抗生物質2種を単離することに成功し、それぞれにエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBと命名した。更に、これらの新規抗生物質が薬剤耐性菌(メチシリン耐性菌等)をふくむグラム陽性の細菌に抗菌活性を示し、また癌細胞の増殖を抑制する抗腫瘍活性を有することを見出した(平成7年12月4日出願の特願平 7-315542号明細書参照)。

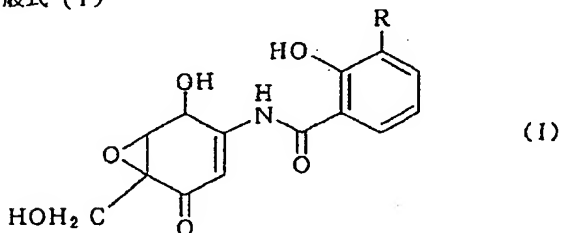
【0006】更に、本発明者らは研究を進めたが、その

結果、アミコラトプシス属に属する前記のエポキシキノマイシンAおよびB生産菌は、エポキシキノマイシンAおよびBと化学構造骨格が共通するが別異の新規な化合物2種を生産していることを見いだした。今回、これら新規な化合物2種を単離することに成功し、それぞれにエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDと命名した。

【0007】また、本発明者らは、微生物の代謝産物の中から抗リウマチ活性を示す物質を検索する研究を鋭意行っていたので、今回発見したエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDが抗リウマチ活性を有するか研究した。その結果、本発明にかかわるエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDが慢性関節リウマチの動物実験モデルであるコラーゲン誘発関節炎を抑制することを見いだした。また、先に本発明者らが発見したエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBも抗リウマチ活性を有することを見いだした。これらの知見に基づいて、本発明が完成された。

【0008】なお、本発明者らが今回新たに得たエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDは、特定の細菌に対して弱い抗菌活性を示したが、各種の癌細胞の増殖を抑制する活性がかなり低いことが認められた。

【0009】従って、第1の本発明においては、次の一般式(I)



E) マススペクトル (m/z): 292 ($M+H$)⁺

290 ($M-H$)⁻

F) 高分解能マススペクトル: 実験値 292.0821 ($M+H$)⁺

計算値 292.0804

G) 分子式: $C_{14}H_{13}NO_6$

H) 紫外線吸収スペクトル:

(i) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に実線で示す。主なピークは次のとおりである。

$\lambda_{max} nm (\epsilon)$ 297(17430)

(ii) 0.01N NaOH-メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に点線で示す。主なピークは次のとおりである。

$\lambda_{max} nm (\epsilon)$ 304(18270), 364(9750)

(iii) 0.01N HCl-メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に破線で示す。主なピークは次のとおりである。

(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す) で表わされる化合物であるエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンD、あるいはこれらの塩が提供される。

【0010】エポキシキノマイシンCおよびDは、弱酸性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム塩などの有機塩基との塩、あるいは各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩も上記の抗リウマチ活性を有する。

【0011】次に、抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDの理化学的性状を記載する。

(1) エポキシキノマイシンCの理化学的性状

A) 外観及び性質: 白色粉末, 弱酸性物質

B) 融点: 168-172°C (分解)

C) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} +128^\circ$ (c 1.0, メタノール)

D) TLCのRf値: 0.31

シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合

$\lambda_{max} nm (\epsilon)$ 296(18140)

I) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法): 添付図面の図2に示す。

$\nu_{max}(cm^{-1})$ 3431, 1604, 1537, 1460, 1309, 1232, 1065, 750

J) ^{13}C -NMRスペクトル (CD_3OD/TMS): 添付図面の図3に示す。

K) 1H -NMRスペクトル (CD_3OD/TMS): 添付図面の図4に示す。

(2) エポキシキノマイシンDの理化学的性状

A) 外観及び性質: 黄かっ色粉末, 弱酸性物質

B) 融点: 163-168°C (分解)

C) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} +142^\circ$ (c 1.0, メタノール)

ル)

D) TLCのRf値: 0.10

シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマト

E) マススペクトル (m/z): 326 (M+H)⁺

324 (M-H)⁻

F) 高分解能マススペクトル: 実験値 326.0431 (M+H)⁺

計算値 326.0417

G) 分子式: C₁₄H₁₂NO₆Cl

H) 紫外線吸収スペクトル:

(i) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルを添付図面の図5に実線で示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ϵ) 299(17590)

(ii) 0.01N NaOH-メタノール溶液中で測定した吸収スペクトルは添付図面の図5に点線で示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ϵ) 304(18950), 367(9230)

(iii) 0.01N HCl-メタノール溶液中で測定したUVスペクトルは添付図面の図5に破線で示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ϵ) 297(18530)

I) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法): 添付図面の図6に示す。

ν_{\max} (cm⁻¹) 3438, 1643, 1533, 1281, 1200

J) ¹³C-NMRスペクトル (CD₃OD/TMS): 添付図面の図7に示す。

K) ¹H-NMRスペクトル (CD₃OD/TMS): 添付図面の図8に示す。さらに、抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDの生物学的性状を次に記載する。

【0012】 A) コラーゲン誘発関節炎抑制作用
コラーゲン誘発関節炎に対する効果を1群5~8のDBA/

グラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合

IJ雄性マウスを用いて調べた。すなわち、タイプIIコラーゲンを等容量のフロイントのコンプリートアジュバントと共に乳化して1mg/mlの投与液を作製した。これをマウスの尾根部の皮内に0.1ml接種して感作した。3週間後に同様の操作方法で乳化したタイプIIコラーゲンの0.1mlをマウスの腹腔内に投与して追加免疫を行ない関節炎を誘発させた。

【0013】 エポキシキノマイシンのAおよびCの2mg/kgまたは4mg/kg、ならびにエポキシキノマイシンBの1mg/kgまたは2mg/kgを最初のコラーゲン接種の日より1週間に3回、合計6週間腹腔内投与した。コラーゲン誘発関節炎の抑制効果は前肢および後肢の発赤、腫脹および強直の程度による0~4のスコア (4肢の合計の最高点は16) により評価した。スコア0は全く症状がみられない場合、スコア1は四肢の指など小関節が1本のみ発赤、腫脹を示す場合、スコア2は小関節が2本以上、あるいは手首、足首などの比較的大きな関節が発赤、腫脹を示す場合、スコア3は1本の手や足全体が発赤、腫脹を示す場合、さらにスコア4は1本の手や足の全体的な腫脹が最大限に達し、しかも関節の強直を伴っていると判断した場合をそれぞれ示す。結果を表1に示す。

【0014】

〔表1〕 コラーゲン誘発関節炎抑制作用

被検化合物	投与量 (mg/kg/日)	一群中の マウス数	スコア	
			観 察 日	
			5週目	6週目
対 照	—	8	9.25±1.35	9.00±1.44
エポキシキノマイシンA	2	6	2.00±1.03**	3.83±0.70**
	4	5	2.00±0.84**	1.20±0.58**
エポキシキノマイシンB	1	5	3.00±1.34*	3.00±1.34*
	2	5	2.25±0.85**	3.50±1.71*
エポキシキノマイシンC	2	5	6.40±0.87	6.80±0.97
	4	5	1.60±0.51**	2.40±0.93**

スコア：平均値±標準誤差

対照群との間の有意差 * p < 0.05、** p < 0.01

【0015】エポキシキノマイシンAの2mg/kg、4mg/kg、エポキシキノマイシンBの1mg/kg、2mg/kg、およびエポキシキノマイシンCの4mg/kgは有意に関節炎のスコアを抑制した。

【0016】B) 抗菌活性
本発明による抗生物質エポキシキノマイシンCおよびD
〔表2〕

の各種細菌に対する最低発育阻止濃度は、次の表2に示す通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学会標準法に基づき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希釈法により測定した。

【0017】

試 験 菌	最低発育阻止濃度 (μg/ml)	
	エポキシキノマイシンC	エポキシキノマイシンD
スタヒロコッカス・アウレウス・スミス	50	>50
スタヒロコッカス・アウレウス MS 9610	100	100
スタヒロコッカス・アウレウス MS 18526	100	100
バストレラ・ピシシダ sp. 6395	50	50

【0018】C) 癌細胞増殖抑制活性
各種の癌細胞を用いて癌細胞の増殖を50%抑制するエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDの濃

度 (IC₅₀ 値) を、MTT法 (『Journal of Immunological Methods』65巻、55-60頁(1983)参照) で測定した。その結果を表3に示す。

【0019】

〔表3〕

供 試 癌 細 胞	I C ₅₀ (μg/ml)	
	エポキシキノ マイシンC	エポキシキノ マイシンD
マウス白血病 L1210	>100	>100
マウス IMCカルシノーマ	>100	>100
エールリッヒ	>100	>100
マウス黒色腫 B16-BL6	>100	>100

【0020】D) 毒性

ICR系雄性マウスにエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDの100mg/kgを腹腔内単回投与したが死亡個体はなく、また毒性症状も見られなかった。また、エポキシキノマイシンCの4mg/kg/日を1週間に3回、合計6週間腹腔内に投与したが死亡個体および毒性症状を示す個体は見られなかった。エポキシキノマイシンCの温血動物に対する毒性は非常に低い。

【0021】表2の結果から明らかなように、本発明によるエポキシキノマイシンCおよびDは、特定の細菌に対して弱い抗菌活性を有するから抗菌剤として有用である。しかし、表3の結果から明らかなように、エポキシキノマイシンCおよびDは各種の癌細胞の増殖を100μg/mlで抑制しなかった。

【0022】さらに第2の本発明によれば、アミコラトプシス属に属する、前記の一般式(1)のエポキシキノマイシンCおよびDの生産菌を栄養培地に培養し、その培養物からエポキシキノマイシンCおよび(または)エポキシキノマイシンDを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキシキノマイシンDの製造法が提供される。

【0023】第2の本発明の方法で使用できるエポキシキノマイシンCおよびDの生産菌の一例としては、アミコラトプシス sp. MK299-95F4 株がある。この菌株は平成6年10月、微生物化学研究所において、宮城県仙台市の土壌より分離された放線菌で、MK299-95F4の菌株番号が付された微生物である。

【0024】このMK299-95F4株の菌学的性状を次に記載する。

1. 形態

基生菌糸はよく分枝し、ジクザグ状を呈する。また分断が認められる。気菌糸は直状あるいは不規則な曲状で、円筒形～長円形の断片または胞子様の構造に分断する。その表面は平滑であり、大きさは約0.4～0.6×1.1～

1.6ミクロンである。輪生枝、菌束糸、胞子のう及び運動性胞子は認められない。

【0025】2. 各種培地における生育状態
色の記載について〔 〕内に示す標準は、コンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル(Container Corporation of Americaのcolor harmony manual)を用いた。

(1) シュクロース・硝酸塩寒天培地(27℃培養)

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生して、溶解性色素は認められない。

(2) グルコース・アスパラギン寒天培地(27℃培養)

うす黄〔2ea, Lt Wheat～2gc, Bamboo〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄を帯びる。

(3) グリセリン・アスパラギン寒天培地(ISP-培地5、27℃培養)

うす黄茶〔3ie, Camel～3le, Cinnamon〕の発育上に、白の気菌糸を着生して、溶解性色素は黄茶を帯びる。

(4) スターチ・無機塩寒天培地(ISP-培地4、27℃培養)

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生して、溶解性色素は認められない。

【0026】(5) チロシン寒天培地(ISP-培地7、27℃培養)

うす黄茶〔2lg, Mustard Tan〕～灰味黄茶〔3lg, Adobe Brown〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素はうす黄茶を呈する。

(6) 栄養寒天培地(27℃培養)

うす黄〔2ea, Lt Wheat〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(7) イースト・麦芽寒天培地(ISP-培地2、27℃培養)

うす黄茶〔3ic, Lt Amber〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(8) オートミール寒天培地 (ISP-培地3、27℃培養)

無色～うす黄 [1 1/2ca, Cream] の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(9) スターチ寒天培地 (27℃培養)

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生して、溶解性色素は認められない。

(10) リンゴ酸石灰寒天培地 (27℃培養)

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生して、溶解性色素は認められない。

【0027】3. 生理的性質

(1) 生育温度範囲

グルコース・アスパラギン寒天培地 (グルコース 1.0%、L-アスパラギン0.05%、リン酸水素二カリウム0.05%、ひも寒天 3.0%、pH7.0) を用い、10℃、20℃、24℃、27℃、30℃、37℃および50℃の各温度で試験した結果、10℃、50℃での生育は認められず、20℃～37℃の範囲で生育した。生育至適温度は27℃付近と思われる。

(2) スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天培地、ISP-培地4及びスターチ寒天培地、いずれも27℃培養)

21日間の培養で、いずれの培地においても陰性である。

(3) メラニン様色素の生成 (トリプトン・イースト・ブロス、ISP-培地1：ペプトン・イースト・鉄寒天培地、ISP-培地6；チロシン寒天培地、ISP-培地7；いずれも27℃培養)

いずれの培地においても陰性である。

【0028】(4) 炭素源の利用性 (ブリードハム・ゴドリブ寒天培地、ISP-培地9；27℃培養)

D-グルコース、D-フルクトース、イノシトール、D-マンニトールを利用して発育し、L-アラビノース、シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。D-キシロースの利用の有無は判然としない。

(5) リンゴ酸石灰の溶解 (リンゴ酸石灰寒天培地、27℃培養)

培養後10日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が認められ、その作用は中等度である。

(6) 硝酸塩の還元反応 (0.1%硝酸カリウム含有ペプトン水、ISP-培地8、27℃培養)

陰性である。

【0029】以上の性状を要約すると、MK299-95F4株は、その形態上、基生菌糸はよく分枝し、ジグザク状を呈し、分断を認める。気菌糸は直状あるいは不規則な曲状で、円筒形～長円形の断片または胞子様の構造に分断する。輪生枝、菌束系、胞子のう及び運動性胞子は認められない。種々の培地で、無色～うす黄～うす黄茶の発育上に白の気菌糸を着生する。一部の培地で溶解性色素は黄あるいは黄茶を帯びる。メラニン様色素の生成、スターチの加水分解及び硝酸塩の還元反応はいずれも陰性で

ある。

【0030】ところで、MK299-95F4株の菌体成分は、細胞壁にメソ型の2, 6-ジアミノピメリン酸、アラビノース及びガラクトースを含み、細胞壁タイプIV型を示した。全菌体中の還元糖はアラビノース、ガラクトースを含むA型であった。グリコレートテストの結果はアセチル型であった。また、ミコール酸は含有せず、リン脂質はPII型 (ホスファチジルエタノールアミンを含みホスファチジルコリン及び未知のグルコサミン含有リン脂質を含まない)、主要なメナキノンハMK-9 (H₄) であった。脂肪酸は16:0、i-15:0、16:1、i-16:0及び17:0を主成分とした。

【0031】以上の結果よりみて、MK299-95F4株はアミコラトプシス (*Amycolatopsis*) 属 (文献:「International Journal of Systematic Bacteriology」36巻、29-37頁、1986年) に属するものと考えられる。アミコラトプシス属の既知菌種を検索すると、アミコラトプシス・スルフレア (*Amycolatopsis sulphurea*) (文献1:同上; および文献2:「International Journal of Systematic Bacteriology」37巻、292-295頁、1987年) が、近縁の種としてあげられた。そこで、MK299-95F4株とアミコラトプシス・スルフレアの当研究所保存菌株とを实地に比較検討中である。現時点ではMK299-95F4株をアミコラトプシス・エスピー (*Amycolatopsis* sp.) MK299-95F4とする。なお、MK299-95F4株を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託申請し、平成7年10月17日、寄託番号がFERM P-15243として受託された。

【0032】第2の本発明の方法を実施するに当っては、アミコラトプシス属に属するエポキシキノマイシンCおよびDの生産菌を栄養培地に接種し、この培地中で培養する。ここで用いる栄養培地は、前記の生産菌が資化できる炭素源と窒素源を栄養成分として含有するものである。

【0033】その栄養源としては、通常微生物の栄養源として通常使用されるもの、例えば炭素源、窒素源、無機塩などの同化できる栄養源を使用できる。例えば、ぶどう糖、麦芽糖、糖蜜、デキストリン、グリセリン、澱粉などの炭水化物や、大豆油、落花生油などの油脂のごとき炭素源、ならびにペプトン、肉エキス、綿実粉、大豆粉、酵母エキス、カゼイン、コーン・スチープリカー、N2-アミン、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの窒素源、さらに燐酸二カリウム、燐酸ナトリウム、食塩、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガンなどの無機塩が使用でき、必要により微量金属例えばコバルト、鉄などを添加することができる。栄養源としては、その他、抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDを生産するのに使用菌が利用しうるものであればいずれの公知の栄養源でも使用できる。

【0034】培地における上記のごとき栄養源の配合割

合は特に制約されるものでなく、広範囲に亘って変えることができ、使用するエポキシキノマイシンCおよびD生産菌によって、最適の栄養源の組成及び配合割合は、当事者であれば簡単な小規模実験により容易に決定することができる。また、上記の栄養源からなる栄養培地は、培養に先立ち殺菌することができ、この殺菌の前または後で、培地のpHを6-8の範囲、特にpH 6.5-7.5の範囲に調節するのが有利である。

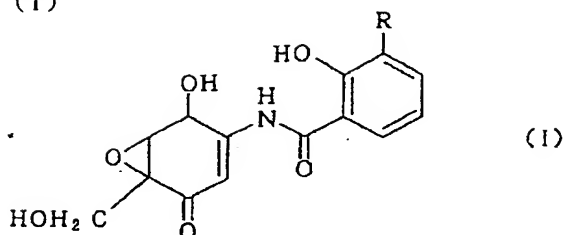
【0035】かかる栄養培地でのエポキシキノマイシンCおよびD生産菌の培養は、一般の放線菌による抗生物質の製造において通常使用されている方法に準じて行なうことができる。通常は好気条件下に培養するのが好適であり、攪拌しながら及び/または通気しながら行なうことができる。また、培養方法としては静置培養、振とう培養、通気攪拌をともなう液内培養のいずれも使用可能であるが、液体培養がエポキシキノマイシンCおよびDの大量生産に適している。

【0036】使用しうる培養温度はエポキシキノマイシンCおよびD生産菌の発育が実質的に阻害されず、該抗生物質を生産しうる範囲であれば、特に制限されるものではなく、使用する生産菌に応じて適宜選択できるが、特に好ましいのは25-30℃の範囲内の温度を挙げることができる。培養は通常はエポキシキノマイシンCおよびDが十分に蓄積するまで継続することができる。その培養時間は培地の組成や培養温度、使用温度、使用生産菌株などにより異なるが、通常は72-120時間の培養で目的の抗生物質を得ることができる。培養中の培地内のエポキシキノマイシンCおよびDの蓄積量はスタヒロコッカス・アウレウス・スミスを使用して、通常の抗生物質の定量に用いられる円筒平板法により定量することができる。

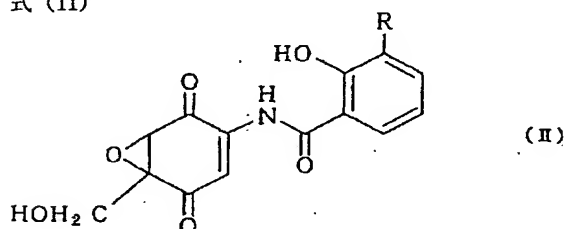
【0037】かくして培養物中に蓄積されたエポキシキノマイシンCおよびDは、これを培養物から採取する。培養後、必要により、濾過、遠心分離などのそれ自体公知の分離方法によって培養物から菌体を除去した後に、その培養濾液を酸性(pH 2-4)に調整し有機溶媒、特に酢酸エチルなどを用いた溶媒抽出や、吸着やイオン交換能を利用したクロマトグラフィー、ゲルろ過、向流分配を利用したクロマトグラフィーを単独または、組み合わせる使用することにより単離精製して目的の抗生物質を採取することができる。吸着やイオン交換能を有するクロマトグラフィー用担体としては、活性炭、シリカゲル、多孔性ポリスチレン-ジビニルベンゼン樹脂もしくは各種のイオン交換樹脂を用いることができる。また、分離した菌体からは、適当な有機溶媒を用いた溶媒抽出法や菌体破碎による溶出法により菌体から目的の抗生物質を抽出し、上記と同様に単離精製することができる。かくして、前記した特性を有する新規化合物エポキシキノマイシンCおよびDが得られる。

【0038】さらに、第3の本発明では、前記の一般式

(I)



(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンD、ならびに次の一般式(II)



(式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素原子を示し、またエポキシキノマイシンBでは水素原子を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンB、あるいはこれらの塩から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗リウマチ剤が提供される。

【0039】第3の本発明による抗リウマチ剤においては、有効成分としてのエポキシキノマイシン類あるいはその製薬学的に許容できる塩は製薬学的に許容できる常用の固体または液体担体、例えばエタノール、水、でん粉等と混和されている形の組成物であることができる。

【0040】第3の本発明による抗リウマチ剤で有効成分として用いられるエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBは新規な物質であってこれらの物理化学的性質の詳細は特願平7-315542号明細書に記載されており、またこの明細書には、前記のアミコラトブシス sp. MK 299-95F4株の培養によるそれらの製造法も記載されてある。

【0041】エポキシキノマイシンAおよびBの物理化学的性質の主なところを次に記載する。

(1) エポキシキノマイシンAの理化学的性状

A) 外観および性質：淡黄色粉体、弱酸性物質

B) 融点：168-173℃(分解)

C) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} +44.6^\circ$ (c 0.51, メタノール)

D) TLCのR_f値：0.28

シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマト

グラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合。

【0042】E) 分子式: $C_{14}H_{10}NO_6$ Cl

F) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルの主なピークは次のとおりである。

λ_{max} nm (ϵ) 236(sh. 8900), 255(sh. 5900), 325(8000), 370(sh. 2700)

G) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法)

ν_{max} (cm^{-1}) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1340, 1230

【0043】(2) エポキシキノマイシンBの理化学的性状

A) 外観及び性質: 淡黄色粉体, 弱酸性物質

B) 融点: 178-184°C (分解)

C) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} +32.2^\circ$ (c 0.51, メタノール)

D) TLCのRf値: 0.52

シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合。

【0044】E) 分子式: $C_{14}H_{11}NO_6$

F) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルの主なピークは次のとおりである。

λ_{max} nm (ϵ) 237(6100), 253(sh. 5400), 326(6300)

G) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法)

ν_{max} (cm^{-1}) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1230

【0045】第3の本発明による抗リウマチ剤で有効成分として用いられるエポキシキノマイシンCおよびDならびにエポキシキノマイシンAおよびBは、前記のとおり、慢性関節炎リウマチの動物実験モデルであるコラーゲン誘発関節炎を抑制する活性を有する。エポキシキノマイシンCおよびDならびにエポキシキノマイシンAおよびBは特に抗リウマチ剤として使用される場合に、それらの投与量は症状により異なるが一般に成人一日量10~2000mg、好ましくは20~600mgであり、症状に応じて必要により1~3回に分けて投与するのがよい。投与方法は投与に適した形態をとることができ、特に経口的投与あるいは静脈的投与が望ましい。

【0046】エポキシキノマイシンA~Dは、前記に示すとおり、コラーゲン誘発関節炎に対する抑制作用を有するから、慢性関節リウマチのみならず、自己免疫軽減または抑制剤として、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、結節性動脈周囲炎、潰瘍性大腸炎および若年性糖尿病などの自己免疫疾患の予防または治療にも有効に適用することが期待できる。

【0047】

【発明の実施の形態】次に実施例により本発明を更に詳

細に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものでない。

【0048】**実施例1** 抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDならびにエポキシキノマイシンAおよびBの製造

(A) グリセリン 0.5%、シュークロース 2%、大豆粉 1%、乾燥酵母1%、コーン・スチープ・リカー 0.5%、塩化コバルト 0.001%を含む液体培地(pH7.0に調整)を三角フラスコ(500ml容)に110mlずつ分注し、常法により120°Cで20分滅菌した。これらの培地に、寒天斜面培地に培養したアミコラトプシスsp. MK299-95F 4株 (FERM P-15243)を接種し、その後30°Cで5日間回転振とう培養した。これにより種母培養液を得た。

【0049】グリセリン 2%、デキストリン 2%、バクトーソイトン 1%、粉末酵母エキス 0.3%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%、シリコンオイル1滴を含む液体培地(pH7.4に調整)を三角フラスコ(500ml容)に110mlずつ分注し、常法により120°Cで20分滅菌した。その後、これら培地に、上記種母培養液をそれぞれ2mlずつ接種し、27°Cで4日間回転振とう培養した。

【0050】このようにして得られた培養液を遠心分離して菌体を除去した。培養液 1.8リットル(L)は、6N-HClによりpH2にした後に酢酸ブチル 1.8Lで抽出し、酢酸ブチル層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾固し、残渣をメタノール50mlに溶かしヘキサン50mlで2回洗浄した。メタノール層を減圧下で濃縮乾固すると茶色の油状物(980mg)が得られた。この油状物をシリカゲルカラム(Merck, Kieselgel 60, 120ml)に付し、トルエン-アセトン系(10:1, 5:1, 3:1)で順次溶出するとエポキシキノマイシンAが18mg、エポキシキノマイシンBが19mg、エポキシキノマイシンCおよびDの混合物が170mg得られた。この混合物の51mgをシリカゲルTLC (Merck, Art.105715, クロロホルム-10%含水メタノール=10:1で3回展開)で分離精製すると白色固体のエポキシキノマイシンCが13mg得られ、また黄かっ色粉末のエポキシキノマイシンDが23mg得られた。すなわちエポキシキノマイシンCが融点 168~172°C (分解)の白色粉末として13mgの収量で得られ、またエポキシキノマイシンDが融点 163~168°C (分解)の黄かっ色粉末として23mgの収量で得られた。

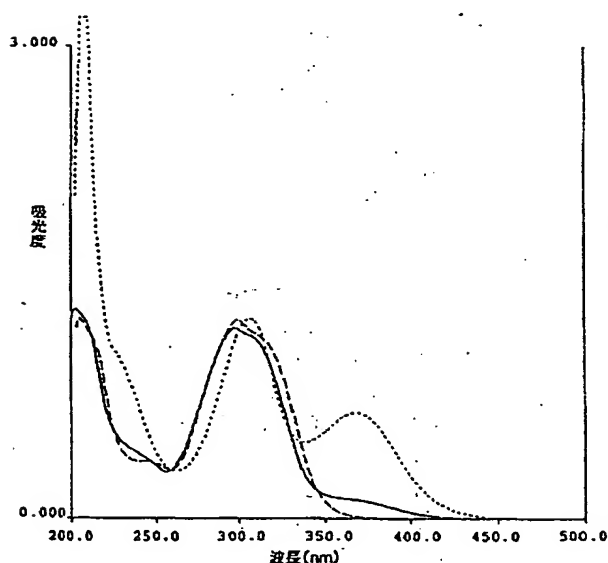
(B) なお、前記の(A)項と同様にして得られた培養液を濾過して菌体を分離した。培養液 2.55リットル(L)を、6N-HClによりpH2にした後に酢酸ブチル 2.55Lで抽出し、酢酸ブチル層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾固し、残渣をメタノール50mlに溶かしヘキサン50mlで2回洗浄し、メタノール層を減圧下で濃縮乾固した。得られた残渣をクロロホルム-メタノール-水(50:10:40, 100ml

1) で分配し、下層を減圧下で濃縮乾固すると、茶色の油状物(0.515 g) が得られた。この油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kieselgel 60, メルク社製, 50ml) に付し、トルエン-アセトン混合溶媒 (10 : 1, 7 : 1, 5 : 1, 3 : 1, 2 : 1) で順次溶出した。得られた活性画分を同条件のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエン-アセトン混合溶媒 (50 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 7 : 1) で順次溶出した。エポキシキノマイシンAおよびBの混合物が 124mg得られた。この混合物の35mgをシリカゲルTLC (展開溶媒: クロロホルム-メタノール, 20 : 1) にかけて分離精製した。エポキシキノマイシンAが融点 168~173℃ (分解) の淡黄色粉末として20mgの収量で得られ、またエポキシキノマイシンBが融点 178~184℃ (分解) の淡黄色粉末として10mgの収量で得られた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 エポキシキノマイシンCのメタノール溶液中、0.01N NaOH-メタノール溶液中および0.01N HCl-メタノール溶液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルである。

【図1】



【図2】 エポキシキノマイシンCのKBr錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

【図3】 エポキシキノマイシンCの重メタノール溶液 (内部標準: トリメチルシラン) にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図4】 エポキシキノマイシンCの重メタノール溶液 (内部標準: トリメチルシラン) にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

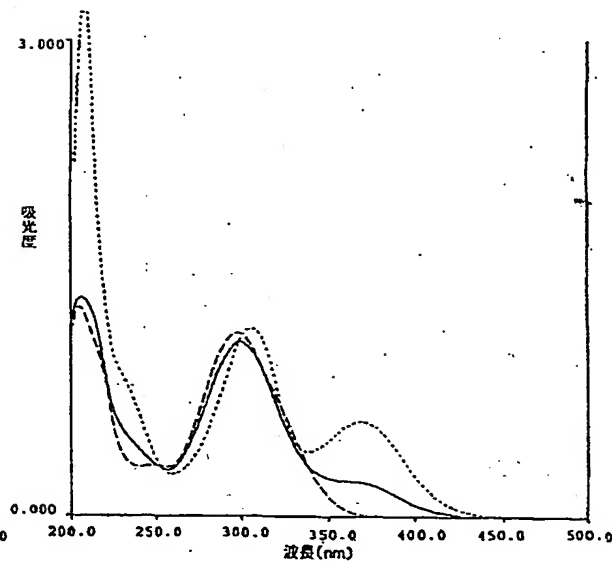
【図5】 エポキシキノマイシンDのメタノール溶液中、0.01N NaOH-メタノール溶液中および0.01N HCl-メタノール溶液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルである。

【図6】 エポキシキノマイシンDのKBr錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

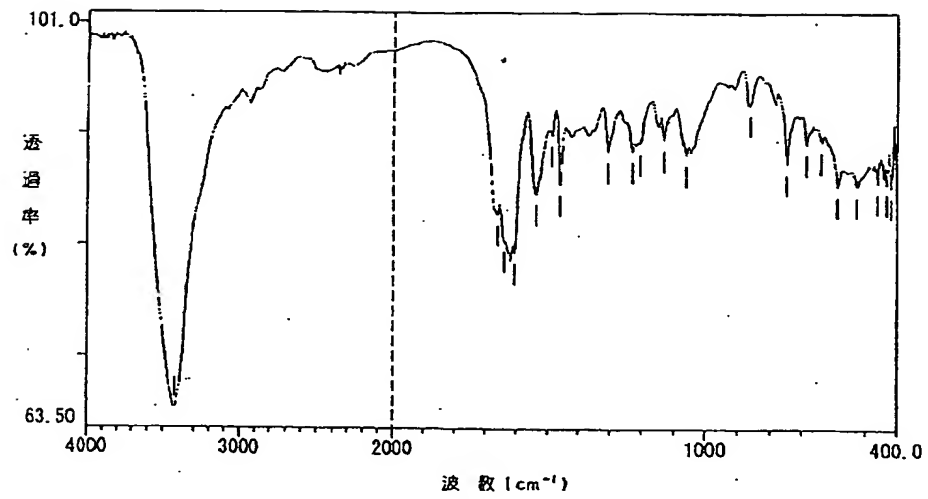
【図7】 エポキシキノマイシンDの重メタノール溶液 (内部標準: トリメチルシラン) にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図8】 エポキシキノマイシンDの重メタノール溶液 (内部標準: トリメチルシラン) にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

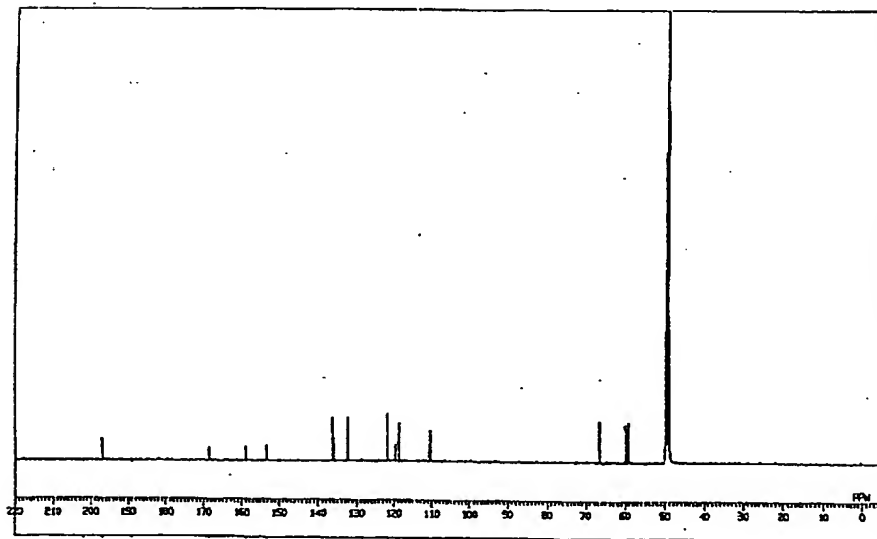
【図5】



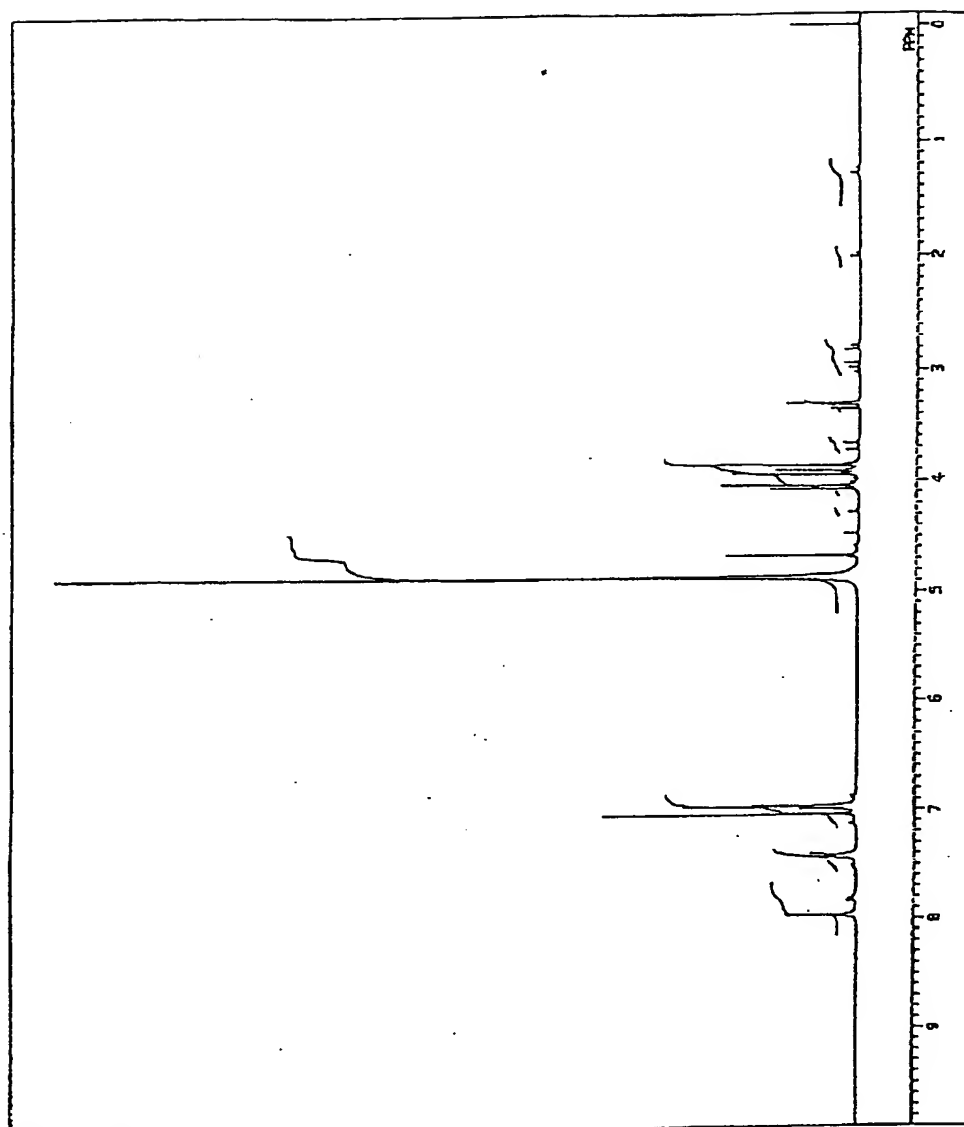
【図2】



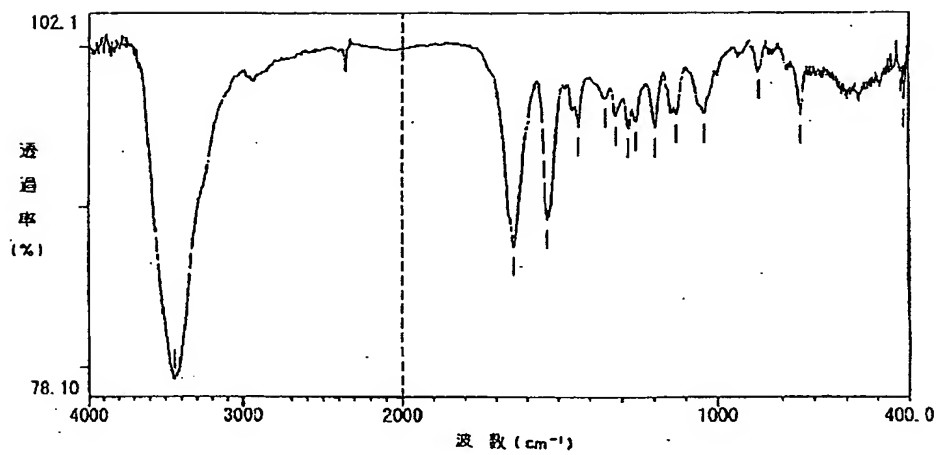
【図3】



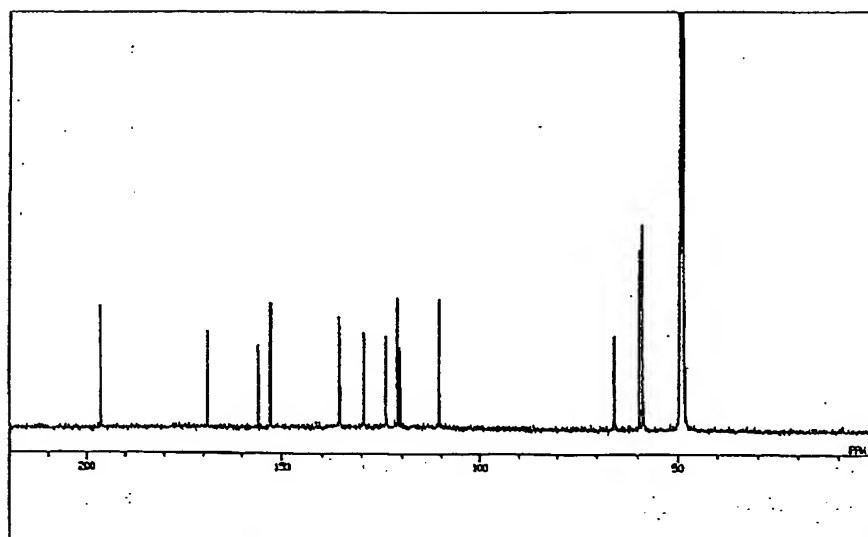
【図4】



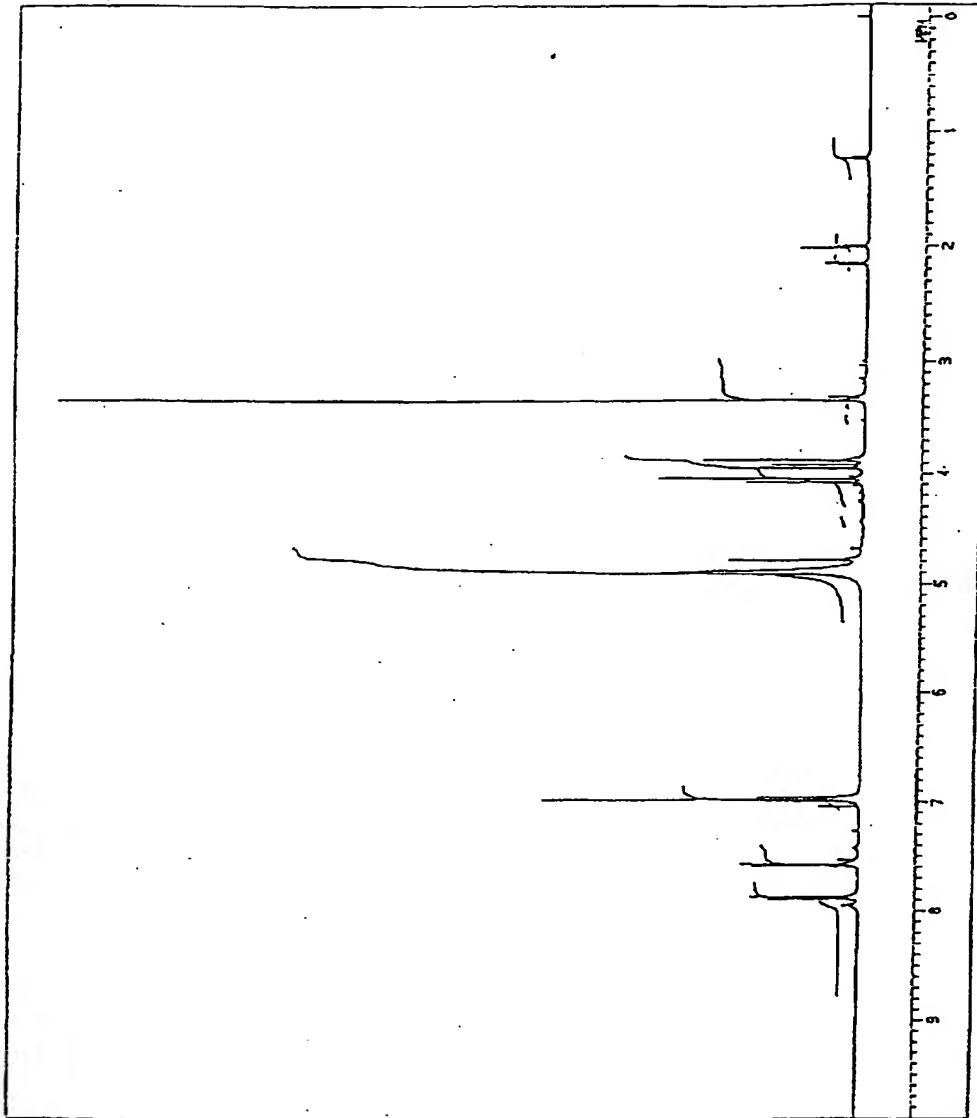
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 飯沼 寛信
神奈川県横浜市緑区白山4丁目61番17号
(72)発明者 澤 力
神奈川県綾瀬市綾西四丁目6番7号
(72)発明者 長縄 博
東京都大田区田園調布本町3番17号

(72)発明者 濱田 雅
東京都新宿区内藤町1番地26 秀和レジデ
ンス405号
(72)発明者 平野 伸一
神奈川県茅ヶ崎市本村5丁目8番1-207
(72)発明者 松本 直樹
神奈川県横浜市旭区さが丘11番地3 第
1グリーンコーポ102

(72)発明者 石塚 雅章
静岡県三島市西若町 6 番 5 号 パストラル
ハイム荏番館411

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.